

HIDROXI-PROPIIL-BÉTA-CIKLODEXTRIN CELLULÁRIS INTERNALIZÁCIÓJÁNAK ÉS LIZOSZÓMÁKRA GYAKOROLT HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

Rusznay Ágnes*, Réti-Nagy Katalin, Váradi Judit, Bácskay Ildikó, Vecsernyés Miklós, Fenyvesi Ferenc

Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszertechnológiai Tanszék



Absztrakt

A ciklodextrinek széles körben alkalmazott segédanyagok a lipofil gyógyszerek vízoldhatóságának és biológiai hasznosíthatóságának növelésére. Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a ciklodextrinek endocitózissal képesek bejutni a Caco-2 intesztinális epitél sejtekbe, azonban a különböző sejtek esetén történő celluláris internalizációt és az intracelluláris hatásait eddig még nem vizsgálták. Mindemellett a 2-hidroxi-propil-béta-ciklodextrin (HPBCD) koleszterin komplexáló tulajdonságának köszönhetően a C típusú Niemann Pick szindróma kezelésére alkalmazott molekula. Munkánk célja a HPBCD celluláris internalizációjának és a sejtekben található lizoszómákra gyakorolt hatásának vizsgálata és összehasonlítása Caco-2 intesztinális epitél, HeLa méhnyak epitél és hCMEC/D3 agyi endotél sejteken.

Kulcsszavak: ciklodextrin, lizoszóma, endocitózis, C típusú Niemann Pick szindróma

INVESTIGATION OF THE CELLULAR INTERNALIZATION OF HYDROXYPROPYL-BETA-CYCLODEXTRIN AND ITS EFFECTS ON LYSOSOMES

Abstract

Cyclodextrins are widely used excipients to increase water solubility and bioavailability of lipophilic drugs. Our research group previously showed that cyclodextrins are able to enter Caco-2 intestinal epithelial cells by endocytosis, however, the cellular internalization and intracellular effects in the case of different cells have not been investigated yet. In addition, 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HPBCD) is a potential molecule for the treatment of Niemann Pick syndrome type C due to its cholesterol complexing properties. The aim of our work is to investigate and compare the cellular internalization of HPBCD and its effect on lysosomes on Caco-2 intestinal epithelial, HeLa cervical epithelial and hCMEC/D3 brain endothelial cells.

Keywords: cyclodextrin, lysosome, endocytosis, Niemann Pick syndrome type C

BEVEZETÉS

A ciklodextrinek széles körben alkalmazott segédanyagok, melyeket főként a gyógyszeriparban alkalmaznak a lipofil hatóanyagok vízoldhatóságának növelésére, stabilizálószerként, a kellemetlen ízek elfedésére, valamint a biológiai hasznosíthatóság növelésére.^{1,2} A ciklodextrinokat kémiai szerkezetük alapján három csoportra oszthatjuk.

Az α -ciklodextrinek hat, a β -ciklodextrinek hét, még a γ -ciklodextrinek nyolc glükopiranoz egységből épülnek fel, α -1,4-glikozidos kötésekkel összekapcsolva. A molekulák belső ürege apoláris, még külső felszíne poláris, mely egyedi tulajdonságuk lehetővé teszi, hogy molekuláris kapszulaként viselkedjenek, azaz más molekulákat magukba zárjanak.³ Ezen molekulák jól ismert biológiai hatásokkal is rendelkeznek.

* A levelező szerző elérhetősége: Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszertechnológiai Tanszék, 4032 Debrecen, Nagyterdei krt. 98; rusznay.agnes@euipar.unideb.hu

Komplexxképző tulajdonságaiknak köszönhetően képesek a sejtmembránban is megtalálható természetes hidrofób molekulákat komplexálni, mely nagymértékben meghatározza alkalmazhatóságukat és biztonságosságukat. Az α -ciklodextrinek a foszfolipideket,^{4,5} míg a β -ciklodextrinek a koleszterint képesek kivonni a sejtmembránból.⁶ A 2-hidroxi-propil-béta-ciklodextrin (HPBCD) endocitózis útján bejuthat a sejtekbe és a Niemann Pick mutáns sejtek késői endoszómáiból, lizoszómáiból képes a megkötött koleszterint mobilizálni.⁷ Ez a felfedezés vezetett a hidroxipropil-béta-ciklodextrin klinikai alkalmazáshoz a C típusú Niemann-Pick szindróma (NPC) kezelésében.⁸ A betegség során a koleszterin tárolása és intracelluláris szállítása gátolt az NPC1 és NPC2 gének mutációja/hiánya miatt, amely a koleszterin felhalmozódását okozza a késői endoszómákban és lizoszómákban, ezáltal neurodegeneratív elváltozásokat okozva.⁹ Az NPC egyik legígéretesebb kezelése a ciklodextrinek alkalmazása.¹⁰ A ciklodextrin tulajdonképpen helyettesíti az NPC fehérjék funkcióját, hiszen molekulárisan kapszulázva felszabadítja a koleszterint a kóros aggregátumokból. Az így képződött HPBCD-koleszterin komplexek ezt követően eljuthatnak a további sejtstruktúrákhoz vagy lizoszómális exocitózis útján távoznak a sejtekből.¹¹ A szisztémásan alkalmazott HPBCD *Npc1*^{-/-} és *Npc2*^{-/-} egerekben is csökkentette a koleszterin felhalmozódást és jelentősen növelte az állatok élettartamát.¹² A HPBCD-t elsőként intravénásan, nagy dózisban (1500-2500 mg/ttkg) alkalmazták, azonban a molekula vér-agy gáton (BBB) való nehéz átjutása miatt a neurológiai tünetek csak kis mértékben javultak. Ma már kisebb dózisban (175-325 mg/ttkg) intratekálisan alkalmazzák a ciklodextrint, amely a tünetek enyhülését, a betegség progressziójának javulását vagy stabilizációját eredményezi. Egy nem randomizált, nyílt, klinikai fázis 1-2 vizsgálat eredménye azt mutatta, hogy az intratekálisan alkalmazott HPBCD lassította a betegség progresszióját.⁸ Mindezek ellenére, a szisztémás beadás kényelmesebb a betegek számára.

Ahhoz, hogy a fent említett neuroprotektív hatásait kifejtsék, a ciklodextrineknek át kell jutniuk a sejtmembránra. Kutatócsoportunk már korábban kimutatta, hogy a HPBCD endocitózissal felvételre kerül a Caco-2 sejtekbe.¹³ Az endocitózis a

sejtek egyik legfontosabb képessége, hiszen a sejt így kommunikál a környezetével.¹⁴ A mechanizmusnak két fő típusát különböztetjük meg. Az egyik a fagocitózis- mely során elsősorban a fagociták képesek felvenni szilárd részecskéket- a másik pedig a pinocitózis-mely során a sejtek folyadékot képesek felvenni. A pinocitózis a vezikulumok mérete, kialakulásuk mechanizmusa, valamint a folyamatban résztvevő fehérjék alapján további alcsoportokra osztható.¹⁵ Az endocitotikus folyamatok során elsődleges vezikulumok képződnek, melyek tartalmukat a korai endoszómákhoz szállítják. Az endoszómális érés során a korai endoszómák késői endoszómákká alakulnak át, amelyek végül fuzionálhatnak a lizoszómákkal. A lizoszómában lévő enzimeknek köszönhetően az endoszóma tartalma lebomlik.¹⁶

Munkánk célja a fluoreszcein (FITC) vagy rodamin (Rho) jelölt HPBCD celluláris internalizációjának és a lizoszómákban való lokalizációjának vizsgálata Caco-2 intesztinális epitél, HeLa méhnyak epitél és hCMEC/D3 agyi endotél sejteken. A Caco-2 sejtvonalat széles körben használják a különböző gyógyszerek vékonybélben történő felszívódásának *in vitro* modellezésére.¹⁷ A HeLa sejtvonal az egyik legrégebbi és legszélesebb körben alkalmazott daganatos sejtvonal a biológiai kutatásokban. A méhnyak epitél sejtek alkalmasak különböző biológiai folyamatok modellezésére.¹⁸ A hCMEC/D3 sejtvonal, az emberi vér-agy gát egyik modellje, mely könnyen fenntartható. A sejtvonal alkalmas a központi idegrendszerben történő gyógyszertranszport, valamint a patológiás mechanizmusok vizsgálatára.¹⁹

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Anyagok

A 2-hidroxi-propil-béta-ciklodextrin (HPBCD) (DS~4,5), a fluoreszceinnel (FITC) és rodaminnal (Rho) jelölt származéka a CycloLab Ltd. (Budapest, Magyarország) termékei. A fluorofor (5/6 izomer keverék) a ciklodextrin primer hidroxilcsoportjához kapcsolódik egy kémiaiilag stabil tioureido-csoporton keresztül. A kísérleteink során használt a LysoTracker® fluoreszcens festék a ThermoFisher Scientific (Magyarország), minden más anyag a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) terméke.

Sejttenyésztés

Az általunk használt Caco-2 intesztinális epitél és HeLa méhnyak epitél sejt vonal a Sejtkultúrák Európai Gyűjteményéből származtak (European Collection of Cell Cultures, ECACC UK), míg a hCMEC/D3 agyi endotél sejt vonal a Merck KGaA (Darmstadt, Németország) termékei. A sejteket 37 °C-on, 5%-os CO₂ atmoszférájú inkubátorban tartottuk fenn rendszeres passzáls segítségével. Az alkalmazott médium Caco-2 és HeLa sejtek esetén a DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium), amelyet kiegészítettünk 10% inaktivált borjú szérummal (Fetal Bovine Serum, FBS), 1% nem esszenciális aminosavval és 1% penicillin-streptomycin oldattal. A hCMEC/D3 sejtek esetén az EndoGRO-MV Complete Media Kit-et használtunk, melyet kiegészítettünk a kit komponenseivel, 2-es típusú növekedési faktorról (FGF-2) és 1% penicillin-streptomycin oldattal. hCMEC/D3 sejtek esetén a sejttenyésztő flaskákat PBS pufferrel 1:20 arányban hígított I-es típusú kollagénnel vontuk be. A Caco-2 sejtek passzáls száma 37-52, a HeLa sejtek passzáls száma 18-30, a hCMEC/D3 sejtek passzáls száma 6-25 közötti volt.

HPBCD celluláris internalizációjának vizsgálata

Fluoreszcens mikroszkópia

A kísérlet során Caco-2 és HeLa sejtek esetén 50.000 db sejtet szélesztettünk egy 12 lyukú műanyag lemezben elhelyezett kör alakú üveg fedőlemezekre, míg hCMEC/D3 sejtek esetén 100.000 db sejtet szélesztettünk egy 24 lyukú műanyag lemezben elhelyezett, kollagénnel bevont kör alakú üveg fedőlemezekre, majd 2 nap elteltével, amikor a sejtek elérték a megfelelő konfluenciát kezeltük a sejteket. A sejteket egyszer lemossuk HBSS-sel, majd Caco-2 és HeLa sejtek esetén 30 percig, hCMEC/D3 sejtek esetén pedig 2 óráig 37 °C-on, sötétben inkubáltuk az 50 µM-os FITC-HPBCD oldatban, illetve kontroll minta esetén HBSS-ben, ciklodextrinek nélkül. Ezt követően a sejteket fixáltuk (3,7%-os formaldehid oldat, 15 perc, szobahőmérséklet), a sejt magokat megfestettük (DAPI festékkel (283 nM), 10 perc, szobahőmérséklet), majd a fedőlemezeket tárgylemezre ragasztottuk és a mintákat másnap fluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss AxioScope A1, Jena, Németország) vizsgáltuk. A minták vizsgálatához a következő szűrőket alkalmaztuk: DAPI: excitációs G 365

nm, emissziós BP 445/50 nm; fluoreszcein: excitációs BP 470/40 nm, emissziós BP 525/50 nm; rhodamin: excitációs BP 546/12 nm, emissziós BP 575-640 nm.

Áramlási citometria

Áramlási citometriai méréseinket a fluoreszcens mikroszkópiával végzett kísérleteink megerősítésére végeztük el. A kísérletek során a sejttenyésztő flaskában lévő sejteket feltripszinezttük (0,05%-os tripszin-EDTA oldat), majd a sejteket kétszer mossuk HBSS-sel és 1x10⁶ sejt/ml koncentrációban szuszpendáltuk újra. Ezt követően a sejteket 30 percig 37 °C-on vagy jégen inkubáltuk 50 µM-os FITC-HPBCD oldatban. Az inkubációs idő elteltével a sejteket háromszor mossuk HBSS-sel, majd az elhalt sejteket megfestettük propidium-jodiddal (PI). A celluláris fluoreszcencia intenzitást Caco-2 sejtek estében Becton Dickinson Beckman Coulter FC-500 (Pasadena, CA, USA), még HeLa és hCMEC/D3 sejtek estében Guava EasyCyte 6HT-2L (Merck Ltd., Darmstadt, Németország) áramlási citométerrel mértük. Kísérleteink során a következő szűrőket alkalmaztuk: fluoreszcein: excitációs 488 nm, emissziós 525/30 nm; propidium-jodid: 695/50 nm.

Lizoszómák vizsgálata

Fluoreszcens mikroszkópia

A kísérlet során Caco-2 sejtek esetén 40.000 db, HeLa sejtek esetén 50.000 db sejtet szélesztettünk egy 12 lyukú műanyag lemezben elhelyezett kör alakú üveg fedőlemezekre, hCMEC/D3 sejtek esetén 50.000 db sejtet szélesztettünk egy 24 lyukú műanyag lemezben elhelyezett, kollagénnel bevont kör alakú üveg fedőlemezekre. Amikor a sejtek elérték a megfelelő konfluenciát (2-3 nap) egyszer mossuk HBSS-sel, majd 50 µM-os fluoreszceinnel vagy rodamminal jelölt HPBCD oldatban inkubáltuk a sejteket 30 percig, 37 °C-on, sötétben. Kontroll minta esetén a sejteket HBSS-ben inkubáltuk, ciklodextrinek nélkül. Az inkubáció után a sejteket háromszor mossuk HBSS-sel, majd 50 nM LysoTracker® festékben inkubáltuk 30 percig, 37 °C-on, sötétben. Ezt követően a sejteket fixáltuk (3,7%-os formaldehid oldat, 15 perc, szobahőmérséklet), a sejt magokat megfestettük (DAPI festék 8283 nM), 10 perc, szobahőmérséklet), majd a fedőlemezeket tárgy-

lemezre ragasztottuk és a mintákat másnap fluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss Axioscope A1, Jena, Németország) vizsgáltuk. A minták vizsgálatához a következő szűrőket alkalmaztuk: DAPI: excitációs G 365 nm, emissziós BP 445/50 nm; fluoreszcein: excitációs BP 470/40 nm, emissziós BP 525/50 nm; rhodamin: excitációs BP 546/12 nm, emissziós BP 575-640 nm.

Áramlási citometria

Áramlási citometriai méréseinket a fluoreszcens mikroszkópiával végzett kísérleteink megerősítésére végeztük el. A kísérletek során a sejtenyészítő flaskában lévő sejteket feltripszineztek (0,05%-os tripszin-EDTA oldat), majd a sejteket kétszer mostuk HBSS-sel és 1×10^6 sejt/ml koncentrációban szuszpendáltuk. Ezt követően a sejteket preinkubáltuk 50 μ M-os HBPCD vagy FITC-HPBCD oldatokban 30 percig, 37 °C-on. Kontroll minta esetén a sejteket HBSS-ben inkubáltuk, ciklodextrin nélkül. Az inkubációs idő elteltével további 30 percig inkubáltuk a sejteket 50 nM-os LysoTracker® festékkel 37 °C-on. Ezt követően a sejteket kétszer hideg HBSS-sel mostuk, fixáltuk (1%-os paraformaldehid oldat) és a celluláris fluoreszcencia intenzitást Guava Easy Cyte 6HT-2L áramlási citométerrel mértük (Merck Ltd., Darmstadt, Németország). A mérések során a következő szűrőket alkalmaztuk: fluoreszcein: excitációs 488 nm, emissziós 525/30 nm; LysoTracker® 695/50 nm.

Statisztikai analízis

A statisztikai analízis elvégzésére SigmaStat 3.5 és GraphPad Prism 5 szoftvert használtunk. Az adatokat átlag \pm SD-ként adtuk meg. A csoportok összehasonlítását ANOVA használatával végeztük el. A különbségeket szignifikánsnak tekintettük $p < 0,05$ esetében.

EREDMÉNYEK

Celluláris internalizáció

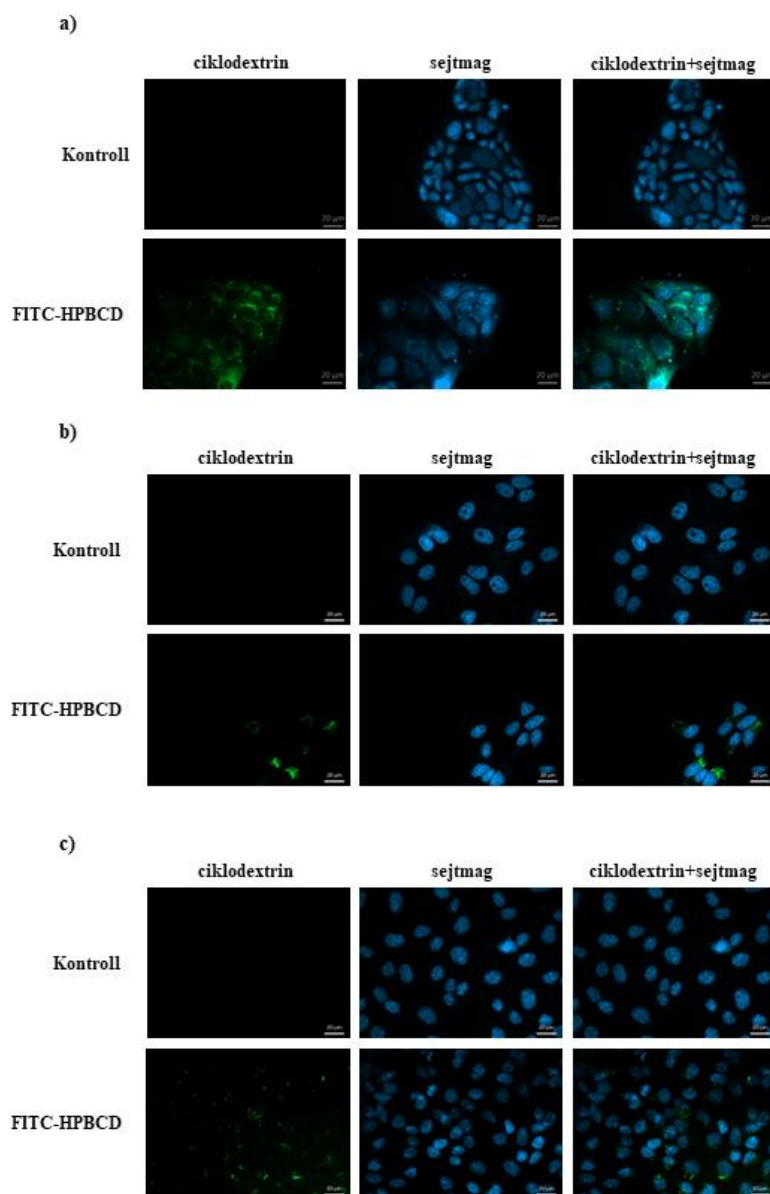
A fluoreszceinnel jelölt HPBCD internalizációját és intracelluláris lokalizációját a sejtvonalakon fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (1. ábra). A származék felvételre kerül a sejtekbe. Celluláris internalizációt követően kisebb vezikulumokban a sejtmembrán mentén, még nagyobb vezikulumokban a sejtmag körül lokalizálódik.

Eredményeinket megerősítettük áramlási citometriával, mely során a sejteket 50 μ M-os FITC-HPBCD oldattal kezeltük 37 °C-on vagy jégen. A jégen inkubált minták esetén mért fluoreszcencia intenzitást a 37 °C-on inkubált minták esetén mért fluoreszcencia intenzitáshoz hasonlítottuk. Mindhárom sejtvonal esetén megfigyelhető, hogy a sejtek szignifikánsan kisebb mennyiségű ciklodextrint vettek fel hűtés esetén, mint 37 °C-on, ami a molekula aktív sejt felvételi folyamatát jelzi (2. ábra).

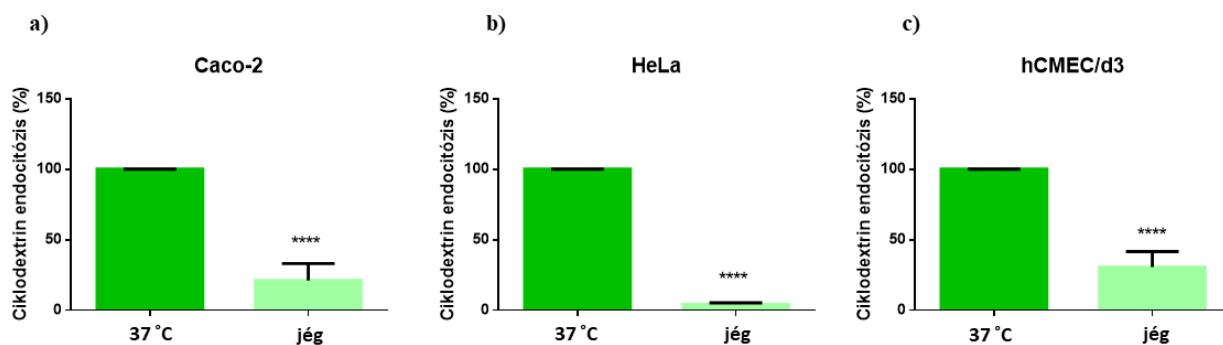
Lizoszómák a sejtekben

Az Rho-HPBCD és a FITC-HPBCD Caco-2 intesztinális epitél, HeLa méhnyak epitél és hCMEC/D3 endotél sejtekben található lizoszómákra gyakorolt hatását először kvalitatívan fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk. A ciklodextrin kezelést követően a lizoszómák a kontroll mintához képest kimutathatóak voltak a sejtekben (3. ábra). A zöld és a piros jel sárga színű kolokalizációja számos intracelluláris vezikulumban megfigyelhető Caco-2 és HeLa sejtekben. Ez azt jelenti, hogy a molekulák celluláris internalizációját követően szignifikáns mennyiségük detektálható a lizoszómákban. A Caco-2 intesztinális epitél sejtek esetén magasabb ciklodextrin tartalmú, nagyobb vezikulumok figyelhetőek meg, mint HeLa sejtek esetén. hCMEC/D3 sejtek esetén detektáltuk a legkevesebb mennyiségű és legkisebb ciklodextrin tartalmú vezikulákat.

Eredményeinket áramlási citometriával igazoltuk. Kísérleteink során jelöletlen HPBCD kezelést követően a LysoTracker lizoszómális festés intenzitása (piros fluoreszcencia) hasonló a csak LysoTrackerrel kezelt mintához, mindhárom sejtvonal esetén. A FITC-HPBCD kezelést követően csak a zöld fluoreszcencia intenzitása emelkedett meg, piros fluoreszcencia intenzitást nem érzékeltek. A fluoreszceinnel jelölt ciklodextrin származékokkal és a LysoTracker festékkel kezelt minták esetében a lizoszómális festés piros fluoreszcencia intenzitása nem haladta meg szignifikánsan a csak LysoTrackerrel festett mintákat (4. ábra). Ebből arra következtetünk, hogy habár a ciklodextrin származékok bejutnak a lizoszómákba, nem indukálják azok számának növekedését, aktivitását.



1. ábra. Ciklodextrinek endocitózis vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal. Fluoreszcens mikroszkópos felvételek FITC-HPBCD kezelt és kezeletlen Caco-2 (a), HeLa (b) és hCMEC/D3 (c) sejtekről. A származék bejut a sejtekbe, kisebb vezikulumokban a sejtmembrán mentén, míg nagyobb vezikulumokban a sejtmag körül lokalizálódik. (Zöld: FITC-HPBCD, kék: sejtmag).



2. ábra. Ciklodextrinek endocitózisának vizsgálata áramlási citometriával. A hűtés hatása FITC-HPBCD endocitózisára Caco-2 (a), HeLa (b) és hCMEC/D3 (c) sejtek esetén, a 37 °C-on kezelt mintához képest. A jégen történő hűtés szignifikánsan gátolta az endocitózist mindhárom sejtvonal esetében. Átlag ±SD ábrázolunk, n= 3, **** p < 0.0001 az ANOVA alapú kontrollhoz képest.

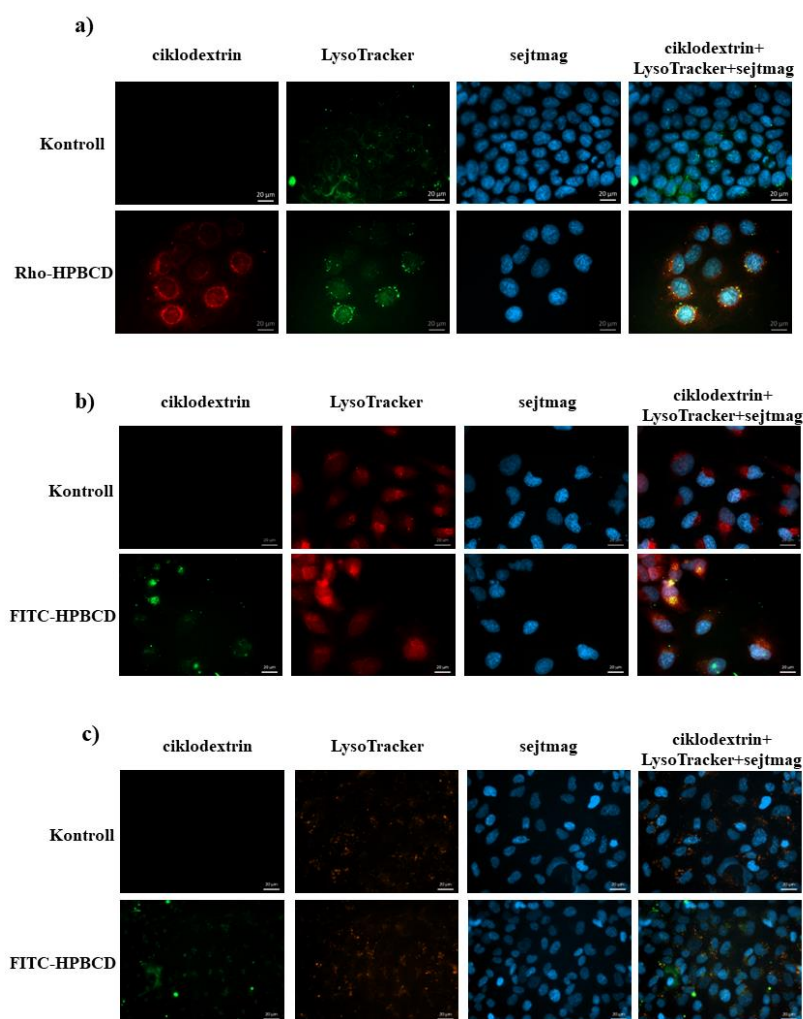
MEGBESZÉLÉS

Ebben a tanulmányban a 2-hidroxi-propil-béta-ciklodextrin (HPBCD) celluláris internalizációját és a sejtekben található lizoszómákra gyakorolt hatását vizsgáltuk és hasonlítottuk össze Caco-2 intesztinális epitél, HeLa méhnyak epitél és hCMEC/D3 agyi endotél sejtekben.

Kutatócsoportunk korábban már kimutatta, hogy a FITC-HPBCD endocitózissal felvételre kerül a sejtekbe¹³, azonban a különböző sejtvonalakon történő internalizációt, valamint a ciklodextrinek intracelluláris hatásait eddig még nem vizsgálták. Fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva megerősítettük korábbi eredményeinket, miszerint a FITC-HPBCD felvételre kerül a sejtekbe. Endocitózist követően a molekula kisebb vezikulumokban a

sejtmembrán mentén, nagyobb vezikulumokban pedig a sejtmag körül lokalizálódik. A ciklodextrin celluláris internalizációját áramlási citometriával erősítettük meg, mely hőmérsékletfüggőnek bizonyult, hiszen a hűtés szignifikánsan csökkentette a származék felvételét mindhárom sejtvonal esetén.²⁰⁻²² Ez azt jelzi, hogy a molekula valamilyen aktív folyamattal kerül felvételre a sejtekbe.

Erre abból következtetünk, hogy hűtés hatására merevvé válik a sejtmembrán, csökken a fluiditása, valamint az ATP-függő aktív folyamatok sem működnek. A vízdékony, nagy molekulatömegű molekulák, mint a ciklodextrinek nem képesek passzív diffúzióval átjutni a sejtmembránon, így a hűtés során kialakult „gélszerű” lipidmembránon sem. Mosással ebben az esetben könnyen eltávolítható volt a jelölt ciklodextrin a mintákból.

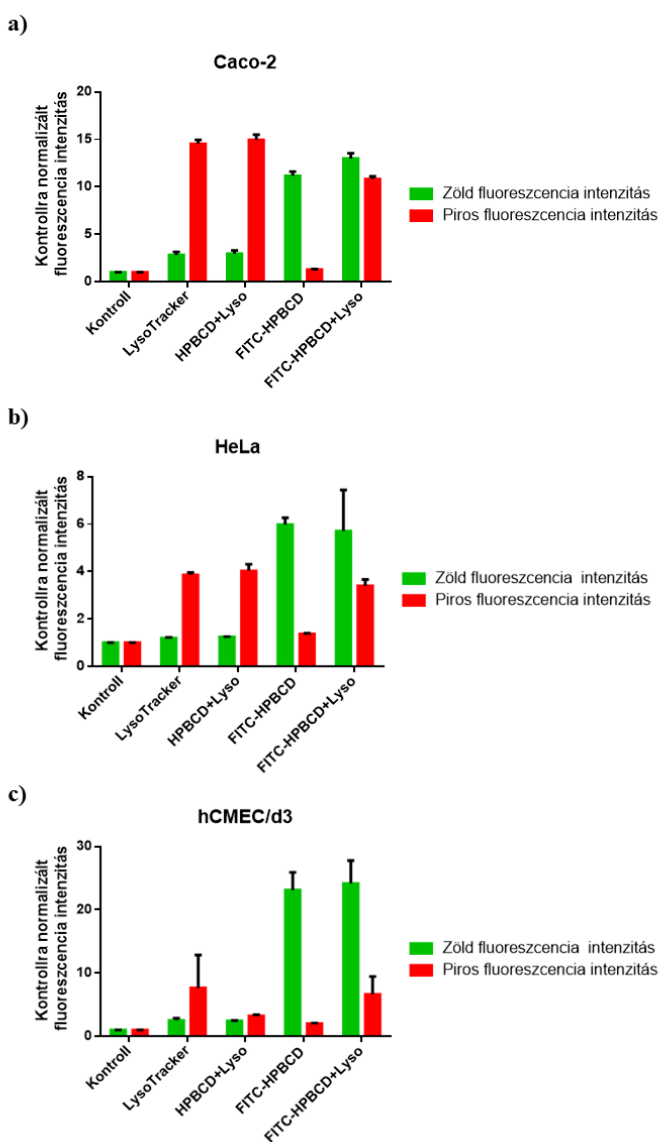


3. ábra. Lizoszómák vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal ciklodextrin kezelést követően. Fluoreszcens mikroszkópos felvételek Caco-2 (a), HeLa (b) és hCMEC/D3 (c) sejtekről a lizoszómák jelölése után. A ciklodextrin származékok képesek bejutni a lizoszómákba. A kolokalizáció sárga jelként jelenik meg a felvételeken.

A HPBCD az egyik leggyakrabban alkalmazott ciklodextrin származék. A molekulát főként a gyógyszeriparban alkalmazzák oldékonyságnövelésre, valamint a biológiai hasznosíthatóság növelésére. Az elmúlt években számos fejlesztés zajlott a C típusú Niemann Pick szindróma (NPC) kezelésére, azonban a figyelem főként a HPBCD-re irányult. A molekula komplexképző tulajdonságának köszönhetően képes megkötni a késői endoszómákban/lizoszómákban felhalmozódott koleszterint és mobilizálni azt.²³ Rosenbaum és munkatársai kimutatták, hogy a HPBCD endocitózissal felvételre kerül a sejtekbe és képes kivonni a koleszterint a NPC mutáns sejtekből.⁷ Ennek pontos mechanizmusát eddig még nem

tárták fel, de a közelmúltban kimutatták, hogy a HPBCD és a 2-hidroxi-propil-gamma-ciklodextrin (HPGCD) a lizoszómához kapcsolódó membránfehérje 1-en (LAMP-1) keresztül segíti elő a koleszterinexportot.²⁴ Kísérleteink során a rövid, 30 perces ciklodextrin hatását vizsgáltuk a sejtekben található lizoszómákra. A jelölt származék intracelluláris lokalizációját vizsgálva azt találtuk, hogy a ciklodextrin származék kolokalizálódott a lizoszómákkal. A három sejtvonal esetén azonban különbségeket találtunk. A legmagasabb ciklodextrin tartalmú és legnagyobb méretű vezikulákat Caco-2 intesztinális epitél sejtek esetén detektáltuk, még a hCMEC/D3 agyi endotél sejtek esetén csak a lizoszómák kis része tartalmazott ciklodextrint.²⁰⁻²² Áramlási citometriai, kvantitatív vizsgálataink alapján elmondható, hogy a HPBCD nem növelte a lizoszómák fluoreszcenciáját, ami valószínűleg arra utal, hogy a ciklodextrin kezelés nem okozza a lizoszómák számának vagy a lizoszómális aktivitás növekedését egyik sejtvonal esetében sem.²⁰⁻²² Singhal és munkatársai azt találták, hogy a HPBCD kezelés szignifikánsan növelte a LAMP-1 fehérje expresszióját NPC1 mutáns sejtekben.²⁵ Ez arra utalhat, hogy a koleszterin transzport molekuláris mechanizmusai befolyásolhatóak, valamint, hogy a HPBCD hatásmechanizmusa összetettebb.

A ciklodextrinek celluláris kompartmentalizációja hasonlóan tűnik mindhárom sejtvonal esetén, ami arra utal, hogy elsősorban a sejtvonalak fiziológiai különbségei határozzák meg a ciklodextrinek endocitózist és intracelluláris sorsát. A ciklodextrinek lizoszómákra gyakorolt hatása, valamint a kompartmentben való bejutásában az egyes sejtvonalak között különbségeket találtunk, melyek új utat nyithatnak meg a koleszterin tárolási rendellenességgel járó betegségek kezelésében.



4. ábra. Lizoszómák vizsgálata áramlási citometriával jelületlen HPBCD és FITC-HPBCD kezelés után. A Caco-2 (a), HeLa (b) és hCMEC/D3 (c) sejtekben található lizoszómák vizsgálata áramlási citometriával. Átlag ±SD ábrázolunk. (n=4)

Megjegyzés

A publikáció az MDPI *Pharmaceutics* folyóiratban 2021. január 25-én megjelent "Investigation of the Cellular Effects of Beta-Cyclodextrin Derivatives on Caco-2 Intestinal Epithelial Cells", az MDPI *Molecules* folyóiratban 2022. február 28-án megjelent "Cellular Effects of Cyclodextrins: studies on HeLa Cells" és az MDPI *Molecules* folyóiratában 2022. november 10-én megjelent "Effects of Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin on Cultured Brain Endothelial Cells" című publikációk magyar nyelvű másodközlése.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A publikáció a TKP2021-EGA-18 számú projekt a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a TKP2021-EGA pályázati program finanszírozásában valósult meg. A közlemény elkészítését a GINOP-2.3.4-15-2020-00008 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.

ÖSSZEFÉRHETLENSÉGI NYILATKOZAT

Nincs összeférhetlenség.

IRODALOM

1. Crini G, Fourmentin S, Fenyvesi É, Torri G, Fourmentin M, Morin-Crini N. Cyclodextrins, from molecules to applications. *Environ. Chem. Lett.* 2018;16:1361–75.
2. Szente L, Szejtli J. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci Technol.* 2004;15:137–142.
3. Szejtli J. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure Appl Chem.* 2004;76:1825–45.
4. Fauvelle F, Debouzy JC, Crouzy S, Göschl M, Chapron Y. Mechanism of α -cyclodextrin-induced hemolysis. 1. The two-step extraction of phosphatidylinositol from the membrane. *J Pharm Sci.* 1997;86:935–43.
5. Debouzy JC, Fauvelle F et al. Mechanism of α -cyclodextrin induced hemolysis. 2. A study of the factors controlling the association with serine-, ethanolamine-, and choline-phospholipids. *J Pharm Sci.* 1998;87:59–66.
6. Kilsdonk EPC, Yancey PG et al. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem.* 1995;270:17250–6.
7. Rosenbaum AI, Zhang G, Warren JD, Maxfield FR. Endocytosis of beta-cyclodextrins is responsible for cholesterol reduction in Niemann-Pick type C mutant cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2010.
8. Ory DS, Ottinger EA et al. Intrathecal 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin decreases neurological disease progression in Niemann-Pick disease, type C1: a non-randomised, open-label, phase 1–2 trial. *Lancet.* 2017;390:1758–68.
9. Vanier M, Millat G. Niemann-Pick disease type C. *Clin Genet.* 2003;64:269–81.
10. Matencio A, Navarro-Orcajada S, González-Ramón A, García-Carmona F, López-Nicolás JM. Recent advances in the treatment of Niemann pick disease type C: A mini-review. *Int J Pharm.* 2020;584:119440.
11. Chen FW, Li C, Ioannou YA. Cyclodextrin induces calcium-dependent lysosomal exocytosis. *PLoS One.* 2010;5:e15054.
12. Davidson CD, Ali NF et al. Chronic cyclodextrin treatment of murine Niemann-Pick C disease ameliorates neuronal cholesterol and glycosphingolipid storage and disease progression. *PLoS One.* 2009;4:e6951.
13. Fenyvesi F, Réti-Nagy K et al. Fluorescently labeled methyl-beta-cyclodextrin enters intestinal epithelial Caco-2 cells by fluid-phase endocytosis. *PLoS One.* 2014;9:1–11.
14. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:857–902.
15. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003, 422, 37–44.
16. Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J.* 2011;30:3481–500.
17. Lakshmana Rao A, Sankar GG. Caco-2 cells: an overview. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Health Care.* 2009;1(2):260–75.
18. Jonathan JM, Pyl LPT et al. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 (Bethesda).* 2013;3(8):1213–1224.
19. Weksler B, Romero IA, Couraud PO. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS.* 2013;10(1):16.
20. Ruzsnyák Á, Malanga M et al. Investigation of the cellular effects of beta-cyclodextrin derivatives on caco-2 intestinal epithelial cells. *Pharmaceutics.* 2021;13:157.
21. Ruzsnyák Á, Palicskó M et al. Cellular effects of cyclodextrins: studies on HeLa cells. *Molecules.* 2022;27:1–12.
22. Veszélka S, Mészáros M et al. Effects of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on cultured brain endothelial cells. *Molecules.* 2022;27.
23. Vance JE, Karten B. Niemann-Pick C disease and mobilization of lysosomal cholesterol by cyclodextrin. *J Lipid Res.* 2014;55:1609–21.
24. Singhal A, Szente L, Hildreth JEK, Song B. Hydroxypropyl-beta and -gamma cyclodextrins rescue cholesterol accumulation in Niemann-Pick C1 mutant cell via lysosome-associated membrane protein 1. *Cell Death Dis.* 2018;9:1–13.
25. Singhal A, Krystofiak ES, Jerome WG, Song B. 2-Hydroxypropyl-gamma-cyclodextrin overcomes NPC1 deficiency by enhancing lysosome-ER association and autophagy. *Sci Rep.* 2020;10:8663.